

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS



**OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE *Cannabis sativa* L. *IN VITRO*, POR  
CITOCININA NO CONVENCIONAL, METATOPOLINA.**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE LA  
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCTIVIDAD FRUTÍCOLA**

**PRESENTA**

**GRISEL PALOMA VILLEZCAS VILLEGAS**

CHIHUAHUA, CHIH., NOVIEMBRE DE 2020

TÍTULO DE LA TESIS:

**OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE *Cannabis sativa* L. *IN VITRO*, POR  
CITOCININA NO CONVENCIONAL, METATOPOLINA.**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

**BIOTECNOLOGÍA**




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, certifican que han leído y recomiendan a la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas la aceptación de la tesis de Maestría titulada: **“OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE *Cannabis sativa* L. IN VITRO, POR CITOCININA NO CONVENCIONAL, METATOPOLINA.”**

Realizada por: **GRISEL PALOMA VILLEZCAS VILLEGAS**

Como cumplimiento parcial de los requerimientos para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**

Ratifican que las firmas son verdaderas:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Damián Aarón Porras Flores  
Director  
Facultad de Ciencias Agrotecnológicas

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Teresita de J. Ruiz Anchondo  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
M. C. Saúl Luján Aguirre  
Secretario de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrotecnológicas

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rocio Sánchez Rosales  
Asesor

---

Cd. Universitaria, s/n Campus 1  
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310  
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845  
www.faciatec.uach.mx



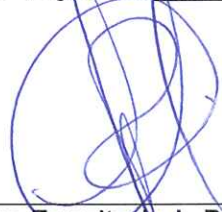
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

The undersigned certify that they have read, and recommend to the Agrotechnological Sciences Department for acceptance, a Master's thesis entitled: **"IN VITRO Cannabis sativa L. CELLS CULTURE, BY NON-CONVENTIONAL CYTOKININE, METATOPOLINE."**

Submitted by: **GRISEL PALOMA VILLEZCAS VILLEGAS**  
In partial fulfillment of the requirements for the degree of **MASTER OF SCIENCE**


Ratify that signatures are real:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Damián Aarón Porras Flores  
Department Chair  
Agrotechnological Sciences Department

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Teresita de J. Ruiz Anchondo  
Major-professor

  
\_\_\_\_\_  
M. C. Saúl Luján Aguirre  
Chairman of Research and Graduate  
Studies  
Agrotechnological Sciences Department

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada  
Advisor

  
\_\_\_\_\_  
Date

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rocio Sánchez Rosales  
Advisor

---

Cd. Universitaria, s/n Campus 1  
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310  
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845  
www.faciatec.uach.mx

## ÍNDICE GENERAL

	Pagina
ÍNDICE GENERAL	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Industria de <i>Cannabis sativa</i> L.	2
2.2 Principales cannabinoides	2
2.3 La biotecnología como estrategia para <i>Cannabis sativa</i> L. medicinal	3
2.4 Propagación convencional	3
2.5 Germinación de semillas	3
2.6 Propagación <i>in vitro</i>	4
2.7 Inducción de callogénesis	5
2.8 Organogénesis directa	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	6
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
V. CONCLUSIONES	23
VI. LITERATURA CITADA	24

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Tesresita de J. Ruiz Anchondo por prestarme su laboratorio de biotecnología y a todas las profesoras que me brindaron su ayuda para la elaboración de esta tesis.

Agradezco especialmente a la Dra. Graciela Ávila Quezada por haberme ayudado en los momentos más difíciles de mi maestría. Es una profesora que, aunque teniendo tanta preparación, siempre trata a sus alumnos con respeto y nunca haciéndolos menos por ser estudiantes.

A la M.C. Samantha Espinoza y Laila Naciff por siempre apoyarme y haberme enseñado todo lo saben sobre tejidos de cultivo vegetal.

## **DEDICATORIA**

A mis padres que siempre me apoyaron en la educación a pesar de los tiempos difíciles y enseñarme la importancia del esfuerzo y su vocación como profesionistas al estar en primera línea de batalla contra la pandemia del COVID19.

A todas y todos los doctores, enfermeros y todos los que trabajan en el sector salud que luchan con su vida para afrontar la pandemia SARS-CoV-2.

A la Dra. Graciela Ávila Quezada le dedico estas palabras: "Nada podrá enseñar aquel que nada sabe, pero tampoco enseñará aquel que, poseyendo conocimientos, no sepa transmitirlos a los demás." Es una profesora ejemplar y siempre la tendré en memoria por haberme enseñado tan valiosa lección. Gracias.

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Metodología embibón.....	<b>8</b>
<b>2</b>	Explantos de hipocótilo basal medio y superior.....	<b>10</b>
<b>3</b>	Métodos evaluados para germinación.....	<b>12</b>
<b>4</b>	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.....	<b>14</b>
<b>5</b>	Resumen de contrastes de hipótesis.....	<b>16</b>
<b>6</b>	TT en formación de callos BAP e IBA.....	<b>18</b>
<b>7</b>	TT de MT y 2,4-D.....	<b>19</b>
<b>8</b>	Supervivencia de los TT de auxinas y citocinas.....	<b>20</b>
<b>9</b>	Sobrevivencia con temperatura diferenciada.....	<b>22</b>
<b>10</b>	Resumen de prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes.....	<b>22</b>
<b>11</b>	Resumen de contrastes de hipótesis.....	<b>22</b>
<b>12</b>	Comparaciones por parejas de TT.....	<b>23</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Semillas expuestas a luz LED blanca con MS 50 % v/v...	<b>9</b>
<b>2</b>	Método por almácigo y suelo.....	<b>12</b>
<b>3</b>	Método de cámara de humedad.....	<b>13</b>
<b>4</b>	Germinación de semillas viables con diferentes tratamientos.....	<b>14</b>
<b>5</b>	Sobrevivencia de semillas a diferente temperatura.....	<b>15</b>
<b>6</b>	Micropropagación de explante.....	<b>15</b>
<b>7</b>	Planta madre.....	<b>16</b>
<b>8</b>	Inducción de callogénesis.....	<b>17</b>
<b>9</b>	Tasa de formación de callo bajo tratamiento .....	<b>20</b>
<b>10</b>	Número de semillas germinadas de <i>C. sativa</i> en método embibón.....	<b>21</b>
<b>11</b>	Porcentaje de supervivencia en método embibón.....	<b>22</b>

## RESUMEN

Se sabe que los metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas a su entorno, pero también representan una fuente importante de productos dentro de la industria en general. Para lograr desarrollar avances innovadores en el cultivo controlado de *Cannabis sativa* L es necesario aplicar diferentes estrategias, utilizando sistemas *in vitro*. *Cannabis sativa* L. es utilizada para la elaboración de nutraceúticos y es importante la detección basada en el perfil bioquímico, la selección de clones de alto rendimiento y su propagación utilizando herramientas biotecnológicas es la forma más adecuada para mantener sus líneas genéticas. La inducción de callogénesis por medio de yemas axilares aisladas en cultivos asépticos de múltiples brotes se encapsularon con éxito para su inducción de desdiferenciación. Para obtener un control de cultivo vegetal fue necesario utilizar métodos de cultivo *in vitro* de variedad mexicana obteniendo un método simple que se pueda emplear en la industria para la elaboración de diversos productos de interés comercial.

**Palabras clave:** cultivo de tejido vegetal, nutraceútico, callosidad, biosíntesis.

## **ABSTRACT**

*Secondary metabolites are known to play an important role in the adaptation of plants to their environment, but they also represent an important source of products within the industry in general. In order to develop innovative advances in the controlled cultivation of Cannabis sativa L it is necessary to apply different strategies, using in vitro systems. Cannabis sativa L. is used to produce nutraceuticals, detection based on the biochemical profile is important. The selection of high-yield clones and their propagation using biotechnological tools is the most appropriate way to maintain their genetic lines. Callus induction by isolated axillary buds in aseptic multi-shoot cultures were successfully encapsulated for their induction of dedifferentiation. To obtain a control of plant cultivation, it was necessary to use in vitro cultivation methods of the Mexican variety, obtaining a simple method that can be used in the industry for the elaboration of various products of commercial interest.*

**Keywords:** *plant tissue culture, nutraceuticals, callosity, biosynthesis.*

## I. INTRODUCCIÓN

El mercado de los nutraceuticos es vasto, abarca muchos productos diferentes con niveles inconsistentes de evidencia disponibles para respaldar su uso (Williamson, 2020). Los nutraceuticos son sustancias que se puede considerar como alimento o como parte de él y que se puede usar para proporcionar a la persona beneficios para su salud, como la prevención o el tratamiento de una enfermedad y como complemento de algunos fármacos (Pérez, 2014). Algunos de ellos, así como sus componentes, han sido aprobados por instancias gubernamentales de gran importancia como la FDA en los Estados Unidos (Valenzuela B., 2014). La FDA tiene una serie de recursos disponibles que abordan el cannabis y los productos derivados del cannabis, como el canabidiol (CBD), y la agencia quiere asegurarse de que los consumidores y otras partes interesadas tengan acceso a estos recursos en una ubicación centralizada (FDA, 2020).

El nivel de reguladores del crecimiento de las plantas (auxina, citoquininas, giberelinas) es un factor importante que controla la formación de callos en el medio de cultivo. Las concentraciones de los reguladores del crecimiento de las plantas pueden variar para cada especie de planta e incluso pueden depender de la fuente del explante o del genotipo individual de la planta, la edad, el estado nutricional, así como también las condiciones de cultivo (temperatura, medios sólidos frente a agar solidificado, la luz) también es importante en la formación y el desarrollo de los callos (Smith, 2013). Por lo tanto, cada callo debe evaluarse por separado para su velocidad de crecimiento, así como las concentraciones de metabolitos intracelulares y extracelulares. Esto permite una evaluación de la productividad de cada línea celular para que solo los mejores sean llevados a suspensiones celulares y estudios de reactor (Bourgaud, 2001). Por otra parte, la evaluación de métodos en germinación *in vivo* e *in vitro* de semillas de *Cannabis sativa* L para obtención de plántulas y el establecimiento una metodología para producción de callos *in vitro* a partir de hipocótilos es necesaria para la obtención de un protocolo de propagación, así mismo se determina la combinación adecuada de hormonas del tipo auxinas y citocininas.

En el 2017 el Diario Oficial de la Federación estipuló en el **Artículo 235 Bis.-** “La Secretaría de Salud deberá diseñar y ejecutar políticas públicas que regulen el uso medicinal de los derivados farmacológicos de la *Cannabis sativa*, índica y americana o marihuana, entre los que se encuentra el tetrahidrocannabinol, sus isómeros y variantes estereoquímicas, así como normar la investigación y producción nacional de los mismos.” Con estos antecedentes, el objetivo del estudio es la elaboración de un protocolo de cultivo de tejido vegetal *in vitro* para la micropropagación controlada de *Cannabis sativa* L.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Industria de *Cannabis sativa* L.

Los tratamientos médicos modernos, como la radioterapia y la quimioterapia, producen muchos efectos secundarios indeseables, y el papel de los suplementos herbales para aliviarlos es objeto de una gran cantidad de investigación (Haixia Dang, 2014). *C. sativa* es una planta herbácea anual que pertenece a la familia Cannabinaceae y se originó en Asia Central, conocida por haber jugado un papel históricamente importante en la producción de alimentos, fibras y medicamentos (S. Frassinetti, 2018). Según datos recientes, los avances en las técnicas de cultivo de *Cannabis sativa* L y el uso de determinadas cepas seleccionadas genéticamente han producido un aumento en el número de cosechas, así como un mayor rendimiento en su producción (UNODC, 2015). Las cepas de cannabis CBD y alto-CBD también son de interés clínico por su supuesta actividad anticonvulsiva y otros efectos farmacológicos (Brian F.Thomas, 2016).

### 2.2 Principales cannabinoides

Los efectos psicotrópicos y de comportamiento de la planta se atribuyen a su contenido de esta clase de compuestos, los cannabinoides, principalmente  $\Delta^9$ -THC, que se producen principalmente en las hojas y las yemas florales de la planta

(Casillas, 2017). Además del  $\Delta 9$ -THC, también hay cannabinoides no psicoactivos con varias funciones farmacológicas, como cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y cannabigerol (CBG), junto con otros componentes no cannabinoides que pertenecen a diversas clases de productos naturales (Brian F.Thomas, 2016).

### **2.3 La biotecnología como estrategia para *Cannabis sativa* L. medicinal**

En la actualidad, la tecnología aplicada para desarrollar nuevos alimentos está en continuo crecimiento y una de las estrategias que se llevan a cabo para producir nuevos productos es el uso de la biotecnología, pues gracias a esta ciencia se han podido obtener alimentos con mayor valor nutricional, incrementando la producción de compuestos nutraceuticos o modificando genéticamente al alimento para que produzca un nutriente o nutraceutico específico (Meléndez-Sosa MF., 2020). La biotecnología está jugando un papel alternativo vital en la producción de metabolitos secundarios de plantas farmacéuticas para apoyar la producción industrial y mitigar la sobreexplotación de fuentes naturales. Los productos farmacéuticos de alto valor que incluyen alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides, entre otros, son biosintetizados como estrategia defensiva por parte de las plantas en respuesta a perturbaciones bajo condiciones ambientales naturales. Sin embargo, también se pueden producir utilizando técnicas de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales mediante la aplicación de diversos enfoques y estrategias *in vitro* (T. Isah, 2017).

### **2.4 Propagación convencional**

Debido a la naturaleza alógama de *C. sativa*, las plantas cultivadas con semillas son altamente heterocigotas y la propagación vegetativa de una planta madre seleccionada solo puede producir un cierto número de esquejes a la vez, presentando así dificultades cuando se necesita una producción a gran escala de *C. sativa* (S. Chandra, 2012). El cultivo de tejidos vegetales se reconoce como una de las áreas clave de la biotecnología debido a su uso potencial para regenerar clones de élite y conservar valiosos recursos fitogenéticos. También ofrece ventajas

para la multiplicación y producción a gran escala de plantas de *C. sativa* (S. Chandra, 2012).

## **2.5 Germinación de semillas**

Se ha informado de una mejora de la germinación de semillas mediante cultivo *in vitro* en banano (Pancholi N., 1995). Se ha informado anteriormente que los efectos de la temperatura, la luz, el tratamiento previo al remojo, GA3, la eliminación de la cubierta de la semilla y la mitad de las semillas afectan la germinación *in vivo* y / o *in vitro* de varios cultivos (Kyauk, 1995).

Las semillas se mantuvieron bajo agua corriente a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavaron con jabón líquido durante 10 minutos. A continuación, las semillas se esterilizaron en la superficie usando alcohol etílico al 70%) durante 30 s seguido de tratamiento con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4% durante 10 s dentro de la cabina de flujo laminar. Para eliminar las trazas de cloro, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se remojaron en agua durante aproximadamente una hora. El medio basal consistió en sales MS sin diluir, sacarosa al 3% y agar al 0,8%. El pH del medio se ajustó a 5,8 y el medio se autoclavó durante 20 min a 121°C. Se vertieron treinta mililitros del medio en cada plato petri de 85 mm. Todas las placas se sellaron con "Parafilm" y se mantuvieron a temperaturas de entre 15 y 40°C en luz, (fotoperiodo de 16 h bajo lámparas fluorescentes tubulares blancas cálidas a 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y condiciones oscuras. La incubación oscura se logró manteniendo las placas envueltas con papel de aluminio en la incubadora. El progreso de la germinación se registró durante un período de 40 días a intervalos de 7 días bajo una luz intensa (J. Bhattacharya, 2001).

## **2.6 Propagación *in vitro***

Aunque se han empleado técnicas *in vitro* para el *C. sativa* durante los últimos 40 años, la regeneración del *C. sativa* mediante la propagación *in vitro* ha sido un desafío con muy pocos informes disponibles hasta ahora. En su mayoría, la propagación del cannabis se ha logrado mediante dos rutas diferentes de organogénesis como organogénesis directa e indirecta (H. Lata S. C., 2015). La

formulación de Murashige y Skoog (MS) es el medio más utilizado para la propagación *in vitro* de genotipos de Cannabis (Murashige y Skoog 1962). Para establecer un protocolo de transformación de *C. sativa* exitoso, es necesario el dominio de las técnicas de cultivo *in vitro*: ya sea que la estrategia sea por explantes de plantas o callos indiferenciados como material de partida, la regeneración de toda la planta es un paso obligatorio. La regeneración de órganos, en particular los brotes, puede ser bastante engorrosa y, por lo tanto, debe llevarse a cabo la selección de diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento de las plantas para encontrar la composición correcta del medio de cultivo (Christelle M. Andre, 2016). Debido a que el objetivo principal es la producción de los metabolitos con mayor rendimiento, la aplicación de la selección de líneas celulares mediante el estudio de cinética de crecimiento en cultivos *in vitro* es esencial para mejorar la producción de moléculas (Murthy, 2014).

## **2.7 Inducción de callogénesis**

Como primer paso en muchos experimentos de cultivo de tejidos, es necesario inducir la formación de callos desde el explante primario. Este explante puede ser una plántula germinada asépticamente o raíces, tallos, hojas o estructuras reproductivas esterilizadas en la superficie (H.Smith, 2013). El callo es un tejido de la herida producido en respuesta a una lesión. El callo es una proliferación de células de la región herida o cortada de un explante. El callo generalmente está formado por células friables, grandes, vacuoladas que están altamente diferenciadas, pero no están organizadas (Smith, 2013).

La mayoría de los protocolos de regeneración *in vitro* desarrollados hasta ahora para *C. sativa* se han realizado a través de la fase de callos (Mandolino G., 1999). Debido a que la regeneración mediada por callos a veces puede conducir a variaciones somaclonales, la propagación de *C. sativa* a través de explantes nodales permite la recuperación de plantas de progenie genéticamente estables y fieles al tipo (S. Chandraa, 2016).



## 2.8 Organogénesis directa

Aunque se encuentran disponibles diferentes rutas para la regeneración del cultivo de tejidos vegetales, la organogénesis directa es un método común de micropropagación que implica la regeneración de tejidos de órganos adventicios o yemas axilares directa o indirectamente de los explantes (Das Bhowmik SS, 2016). La organogénesis directa tiene ventajas, que incluyen menos etapas de cultivo y menos o ninguna posibilidad de variaciones somaclonales y, por lo tanto, mayor estabilidad genética. Sin embargo, se ha desarrollado un protocolo de regeneración de un solo paso, basado en la inducción de brotes adventicios, así como en un enraizamiento eficaz utilizando una nueva citoquinina aromática, la metatopolina (Lataa H. C. S., 2016). De esta manera los estudios más amplios respecto a esta citoquinina aromática se emplean con éxito para la mejora en el crecimiento de cultivo de tejido *in vitro* como en los estudios recientes realizados por Lataa *et al.* en 2016. Debido al crecimiento vigoroso en medio MS + MT (especialmente la concentración de MT que varía de 1  $\mu\text{M}$  a 4  $\mu\text{M}$ ), las plantas se subcultivaron en el mismo medio fresco después de 3 semanas. Las raíces comenzaron a aparecer dentro de las 3-4 semanas y las raíces sanas completamente desarrolladas se formaron a las 6 semanas de cultivo. No se necesitó un medio separado para la iniciación de la raíz. De varias concentraciones de MT probadas, la mejor concentración para enraizamiento fue el medio MS suplementado con 2.0  $\mu\text{M}$  MT (Lataa H. C. S., 2015).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

- ∴ La investigación se realizó en el área de cultivo de células y cultivos vegetales dentro del laboratorio de investigación en Biotecnología de Palntas, en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua el 13 de agosto del 2018.
  
- ∴ Material vegetativo. Se evaluó el trabajo con semillas de *Cannabis sativa* L., spp. Origen desconocido.

I. Obtención de plántulas a partir de semillas.

I a. Como inicio de tratamientos, la viabilidad de germinación de las semillas fue realizada en un almacigo utilizando turba rubia (Peat Moss® Tourbe) estéril como sustrato, a una profundidad de 0.5 cm en charola de unicel 2.5 x 2.5 cm la cavidad, y fueron sembradas 104 semillas las cuales luego fueron colocadas en una germinadora (LUMISTELL® ICP-18) a 28°C con luz blanca continua de 24 horas y un riego con nebulización diaria cada 24 horas con agua destilada en cada pocillo durante 10 días.

I b. También fue evaluado el método de la cámara húmeda donde las semillas fueron cubiertas en papel estraza y 10 mL de agua desmineralizada estéril dentro de una caja Petri de 80 mm y colocados en germinadora (LUMISTELL® ICP-18) a 28°C sin luz durante 10 días.

I c. De la misma manera, fue conducido un ensayo *in vitro* para evaluar la viabilidad de las semillas el cual en todos los medios de cultivo fueron gelificados con 4.6 g L-1 de agar (phytagel SIGMA-ALDRICH®) y sacarosa (SIGMA-ALDRICH®) 30 g L-1 y se esterilizaron en autoclave a 120 °C a 1 atmósfera de presión (0.1 MPa) por 20 minutos. Las cajas Magenta de 60 x 90 mm contenían 10 mL de medio cada una, el pH fue ajustado a 5.6 con 1.0 N hidróxido de potasio (KOH) y 1.0 N de ácido clorhídrico (HCl). El pH del medio de cultivo de tejido vegetal generalmente se ajusta a pH 5.5 a 6. Por debajo de 5.5, el agar no gelificará adecuadamente y por encima de 6.0, el gel puede ser demasiado firme (Murashige, 1973). Las condiciones de incubación fueron 25 °C ± 1 fotoperiodo de 18 horas luz.

Las semillas fueron desinfectadas en cámara de flujo laminar con una solución de 10 gotas de tensoactivo Tween80 por 20 minutos, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, se sumergieron con etanol (ETHO) al 70 % v/v por 5 minutos y enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente se adicionó hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 % v/v (cloro activo) por 10 minutos y enjuague con agua destilada estéril. Por último, se empleó solución de Thymerosal™ al .05

% v/v y remoción de soluciones con enjuagues consecutivos de agua destilada estéril.

La germinación *in vitro* se realizó en medio MS (Murashigue & Skoog 1962) (sacarosa y phytigel SIGMA-ALDRICH®) de pH 5.6, donde se sembraron 20 semillas en tubos de ensaye con capacidad de 30 mL con 10 mL de medio MS 50% v/v fuerza de sales.

I d. Además, se empleó el método en embibón para romper dormancia en 10 semillas con 5 mL de agua destilada estéril en un matraz con tapa rosca y capacidad de 25 mL a tres diferentes temperaturas ( $T_1=20^\circ\text{C}$ ,  $T_2=24^\circ\text{C}$ ,  $T_3=28^\circ\text{C}$ ) en un periodo de 24 horas en incubadora FELISA® (cuadro 1). Posteriormente se colocaron en medio MS 50% v/v fuerza de sales para su elongación *in vitro*.

Todo el experimento se realizó en campana de flujo laminar y con material desinfectado y esterilizado.

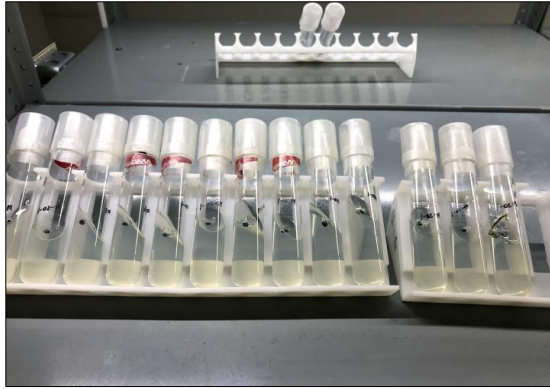
**Cuadro 1.** Metodología embibón con temperatura controlada en incubadora FELISA® y sus resultados fueron observados cada 24 horas. Para su germinación se agregaron 10 semillas por cada 5 mL de agua destilada estéril en un matraz con tapa rosca y capacidad de 25 mL. Posteriormente se colocaron en medio MS 50% v/v fuerza de sales para su elongación *in vitro*.

EXPERIMENTO	SEMILLAS	TEMP. °C
1	10	20
2	10	24
3	10	28

## II. Establecimiento *in vitro* para la obtención de plántulas.

El ensayo se condujo como sigue:

Una semilla por tubo. Las semillas fueron colocadas en un medio de cultivo descrito en el inciso I c:



**Figura 1.** Medio MS 50 % v/v. Semillas expuestas a luz LED blanca con fotoperiodo de 18 hrs.

### *Callogénesis.*

El hipocótilo superior fue utilizado para la inducción de desdiferenciación celular. Estos explantes fueron cultivados en medio MS (Murashige y Skoog 1962), adicionados con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; en la primera base del experimento se empleó una porción mayor de precursor para la aceleración en respuesta a la división celular, 6-bencilaminopurina (BAP), más una dosis menor de precursor que estimule su crecimiento, como el ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butílico (IBA) (cuadro 2). Diversas literaturas muestran mejores resultados empleando metatolpolina (MT) (Brian F.Thomas, 2016), y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (H.Smith, 2013) como precursor bioquímico en combinación para la callogénesis (cuadro 2).

El diseño de tratamientos consistió en 3 combinaciones (cuadro 2) CONC I + CONC II + CONC III, para nueve tratamientos en los cuales se utilizaron 3 secciones del hipocótilo; basal, medio y superior (Hb; Hm; Hs).

**Cuadro 2.** Explantes de hipocótilo basal medio y superior (en segmentos de medio centímetros sin hojas ni raíz. El medio de inducción son combinaciones aleatorias de citocininas y auxinas (BAP/ANA; BAP/IBA; y MT/2,4-D).

TT	EXPLANTE (Hipocótilo)	[CONC I] (BAP) : (ANA)	[CONC II] (BAP) : (IBA)	[CONC III] (MT) : (2,4-D)
TT1	Hb; Hm; Hs	1.5 ; 0.3	1.5 ; 0.3	1.5 ; 0.3
TT2	Hb; Hm; Hs	3 ; 0.3	3 ; 0.3	3 ; 0.3
TT3	Hb; Hm; Hs	4 ; 0.3	4 ; 0.3	4 ; 0.3
TT4	Hb; Hm; Hs	1.5 ; 0.5	1.5 ; 0.5	1.5 ; 0.5
TT5	Hb; Hm; Hs	3 ; 0.5	3 ; 0.5	3 ; 0.5
TT6	Hb; Hm; Hs	4 ; 0.5	4 ; 0.5	4 ; 0.5
TT7	Hb; Hm; Hs	1.5 ; 1	1.5 ; 1	1.5 ; 1
TT8	Hb; Hm; Hs	3 ; 1	3 ; 1	3 ; 1
TT9	Hb; Hm; Hs	4 ; 1	4 ; 1	4 ; 1

La callogénesis se expresó como el porcentaje de explantes que formaron callos. Posterior a la inducción, los callos de los diferentes explantes fueron transferidos a un medio de cultivo MS, sin reguladores de crecimiento, suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, agar 4.6 g L<sup>-1</sup> y medio de multiplicación adicionado con ácido giberélico (GA3) al .03 mg L<sup>-1</sup> y mantenidos durante 15 días en cámara de incubación, con un fotoperiodo de 16 h luz para su micropropagación con las condiciones de incubación de 25 °C ± 1. Al respecto, el ácido giberélico (GA3) controla aspectos importantes en el desarrollo de las plantas, actuando como estimulantes del crecimiento, por lo que se obtiene un mayor tamaño. Una de las funciones más importantes de las GA3 es la promoción del crecimiento del tallo, hojas y raíces, esto se debe a la inducción de la división celular, pues acortan la interface del ciclo celular al inducir a las células a sintetizar ácido desoxirribonucleico (Martínez, 2013). Por lo que en el presente trabajo el medio de multiplicación adicionado con GA3 se utiliza para su propagación *in vitro* para la obtención de una cantidad mayor de material vegetativo.

*Diseño experimental y análisis de los datos.*

Cada tratamiento constó de nueve Magentas™ con dos explantes cada una, utilizando la Magenta™ como unidad experimental, tanto para la etapa de inducción como de diferenciación.

El análisis estadístico para la formación de callo se realizó usando pruebas no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov para una muestra a  $P \leq 0.05$ , con el programa IBM SPSS Statistics Versión 26.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

*Germinación in vivo*

Los ensayos para la evaluación de germinación mostraron que aquellos métodos en donde el tiempo de contacto con humedad prolongado fueron los mejores para el rompimiento de la latencia de las semillas, como se ilustra en la Cuadro 3 donde se obtuvo un porcentaje de germinación del 96.15% en almácigo superando 4 veces la germinación por el método embibón con un 20% en porcentaje de germinación. Mientras que *in vitro* solamente se obtuvo un 5% y en cámara húmeda con nulos resultados. Con respecto al tiempo de emergencia, se observó que el método del embibón es el más rápido seguido del almácigo y por último el de *in vitro*.

**Cuadro 3:** Resultados para los métodos de germinación de semilla de *Cannabis sativa* L. spp. Evaluados donde se detalla la cantidad de semillas utilizadas y germinadas por método, el porcentaje de germinación y el tiempo de emergencia en días.

<b>Métodos evaluados para germinación</b>				
<b>Método</b>	<b>Semillas sembradas</b>	<b>Semillas germinadas</b>	<b>% de germinación</b>	<b>Tiempo de emergencia (días)</b>
<b>I a. Almacigo</b>	104	100	96.15	10
<b>I b. Cámara húmeda</b>	20	0	0	0
<b>I c. <i>in vitro</i> MS 50%</b>	20	1	5	22
<b>I d. Embibón + MS 50%</b>	20	4	20	3

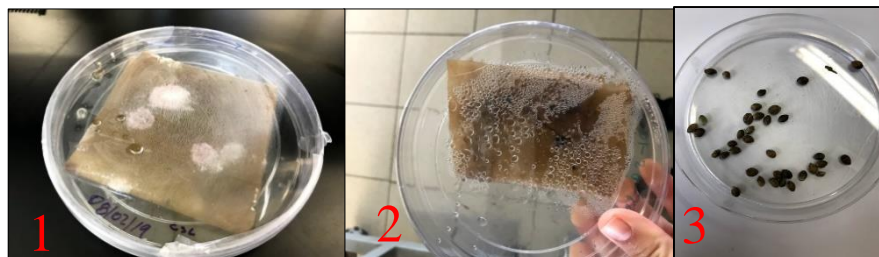
Método I a. En el ensayo de germinación en almacigo, se pudo observar que no hubo contaminación en el sustrato, así como el rompimiento de latencia a los 10 días. A los 12 días, el 100% de las semillas evaluadas resultaron viables.



**Figura 2.** El método por almacigo y suelo. Todas las semillas se reportaron viables a temperatura de 28°C por un periodo de 12 días.

Método I b. Evaluación de la viabilidad de las semillas por el método de cámara de humedad recubierta de papel estroza estéril y agua destilada estéril.

En el primer tratamiento el agua que se utilizó para la hidratación no se encontraba estéril, mientras que en el segundo sí. Aun así, las semillas no lograron romper la recubierta en condiciones de la germinadora a temperatura de 27 °C en un periodo de 10 días. Figura 3.



**Figura 3.** Método I b. Método de cámara de humedad. Como se observa, a los 10 días de evaluación, las semillas no lograron romper latencia, en esas condiciones.

#### Método I c. Evaluación de Germinación *in vitro*

En la metodología *in vitro* con medio MS al 50% v/v después de 20 días el porcentaje de germinación fue del 5% dado a que las 20 semillas que fueron cultivadas se optó por obtener la plántula madre para todos los tratamientos así que se utilizó la que germinó en el menor tiempo a 25 °C  $\pm$  1 expuestas a luz LED blanca con fotoperiodo de 18 horas. La semilla germinada a las cuatro semanas continuó su desarrollo hasta la obtención de hojas con pecíolo, las que se colocaron en forma abaxial en contacto con el medio y el resto de hipocótilo a medio de multiplicación.

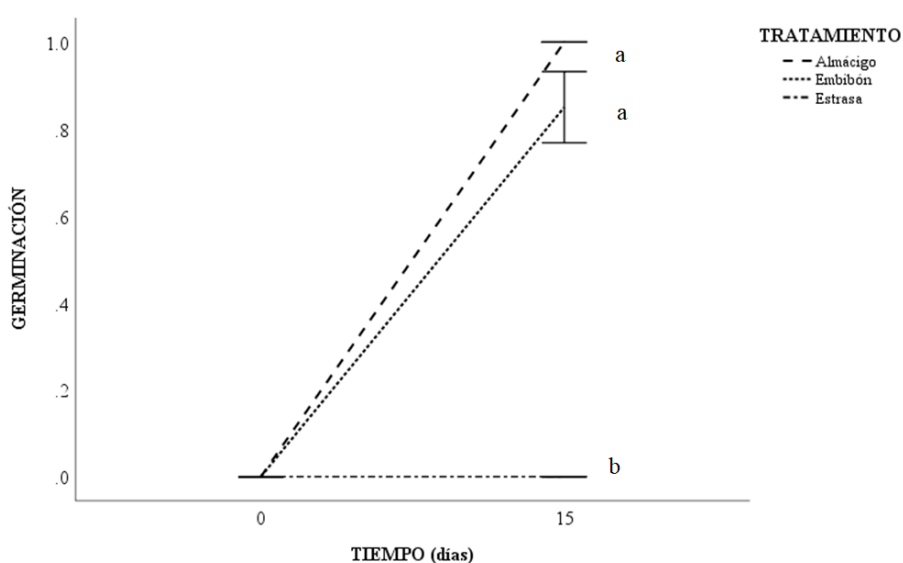
Se han observado dificultades en diferentes estudios para romper dormancia y su posterior cultivo *in vitro*. En un estudio previo se realizaron diferentes metodologías físicas y químicas para la recuperación de embriones en cultivo *in vitro*, por lo que se reportó que la mejor opción fue la mecánica para las pruebas de germinación como se describe a continuación donde el porcentaje de embriones sanos fue bajo; en la prueba que se realizó por corte en la semilla, fueron 39.45 % en promedio y 60.55 % estaban dañados; con la separación por columna densimétrica se



obtuvieron 33.45 % sanos y 66.55 % dañados; no hubo grandes diferencias entre las dos técnicas, sin embargo, por el método manual se contabilizó un mayor número de embriones sanos (Santacruz F., 2014).

El análisis estadístico para la evaluación de distintos métodos de germinación, arrojó que son significativamente diferentes entre tratamientos, como se ilustra en la Figura 4.

**Sobrevivencia de semillas a diferente temperatura**



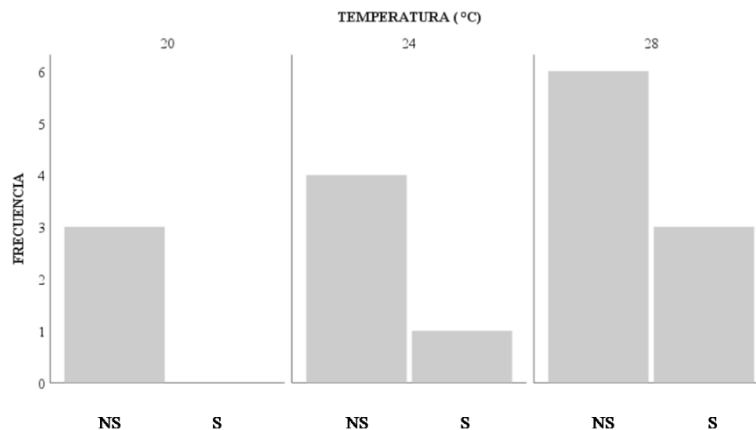
**Figura 4.** Germinación de semillas viables con diferentes tratamientos. Valores con letras diferentes (a,b) son significativamente diferentes entre tratamiento según prueba de Kruskal-Wallis ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.  $P \geq 0.05$ .

**Cuadro 4.** Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

Comparaciones por parejas de tratamiento					
Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
es-em	61.200	15.921	3.844	0.000	0.000
es-al	72.000	12.293	5.857	0.000	0.000
em-al	10.800	12.293	0.879	<b>0.380</b>	1.000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales).  $P \geq .05$ . De ahí se considera que hubo significancia entre tratamientos.

### Sobrevivencia de semillas a diferente temperatura



**Figura 5.** NS: No sobrevivencia, S: Sobrevivencia. No se observó significancia entre categorías de temperatura según prueba de Kruskal-Wallis.  $P \geq 0.05$

### Multiplicación *in vitro*.

Las vitroplantas obtenidas a partir del ensayo de germinación, colocados en el medio evaluado para la obtención de material vegetativo, como se ilustra en la Figura 6, donde se colocaron en medio descrito MS al 50% mas GA3 0.03 ppm. Con explantes apicales.



**Figura 6.** Micropropagación de explante apical para inicio de ensayo con tratamientos en medio de multiplicación MS adicionado con GA3 .03 mg L<sup>-1</sup>.

Evaluación de la formación de calogénesis. En la figura 7, se ilustra el tipo de planta madre utilizada para el ensayo de formación de tejido calloso a partir de hipocótilos, los cuales fueron tomados y segmentados. Planta sana y de buen tamaño.



**Figura 7.** Ilustración de planta madre para la obtención de hipocótilos para la prueba de formación de callo.

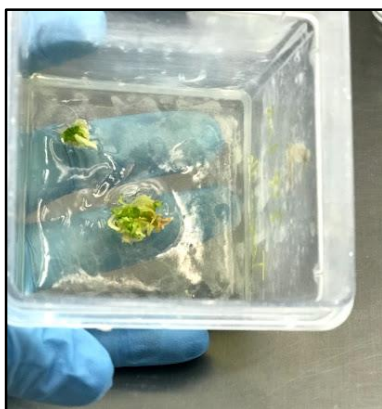
**Cuadro 5. Resumen de contrastes de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	Las categorías de TRAT se dan con las mismas probabilidades.	Prueba de chi-cuadrado para una muestra	1.000	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de CALLO es normal con la media 0 y la desviación estándar .396.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra	.000 <sup>a</sup>	Rechace la hipótesis nula.

a. Lilliefors corregido. Entre categorías de tratamiento no se observaron diferencias. Entre niveles de tratamiento se muestran significaciones asintóticas.  $P \geq .05$ .

El análisis estadístico para la formación de callo se realizó usando pruebas no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov para una muestra a  $P \leq 0.05$ , con el programa IBM SPSS Statistics Versión 26.

En el ensayo *in vitro* evaluado, se observó que durante la formación de callogénesis los tratamientos que desarrollaron tejido des-diferenciado fueron los explantes donde se utilizó el hipocótilo superior, en los tratamientos 8 y 9 con concentraciones de BAP/IBA 3.0/1.0 ppm y 4.0/1.0 ppm respectivamente utilizando 6-bencilaminopurina como BAP, y de ácido indol-3-butírico IBA, como auxina. Como se describe en el cuadro 2.



**Figura 8.** Inducción de callogénesis con la hormona citocina metatolpolina (MT) en combinación con la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

En la [COMB I], donde se evaluaron la combinación de CIT/AUX; [BAP/IBA], se obtuvieron resultados positivos en la formación de callo cuando la concentración de la citocinina era de 3 ppm y de la auxina 1 ppm; o de 4ppm de citocinina y la auxina 1 ppm, como se muestra en el cuadro 6. Se obtuvieron resultados negativos en todas las demás combinaciones

**Cuadro 6.** Los 9 tratamientos en formación de callos 6-bencilaminopurina (BAP) e ácido indol-3-butírico (IBA) ha obtenido una formación de callo con los tratamientos 8 y 9 como los mejores para el desarrollo de callo con un total de 2 formaciones de tejido desdiferenciado.

TRATAMIENTOS	BAP (ppm)	IBA (ppm)	CALLO
1	1.5	0.3	0
2	3.0	0.3	0
3	4.0	0.3	0
4	1.5	0.5	0
5	3.0	0.5	0
6	4.0	0.5	0
7	1.5	1.0	0
8	3.0	1.0	1
9	4.0	1.0	1

Un sistema de regeneración eficiente y de un solo paso para la rápida proliferación de brotes axilares y el enraizamiento *in vitro* de explantes nodales de *C. sativa* utilizando metatopolina (MT), una citoquinina aromática natural (H. Lata S. C., 2015).

Como se puede observar en la cuadro 7, los tratamientos de inducción de callo utilizando la combinación de la citocinina sintética metatopolina (MT) y el herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 1.5 ppm, 3.0 ppm y 4.0 ppm de metatopolina (MT) y 1.0 ppm de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), que presentaron un aumento en desdiferenciación celular a partir de las concentraciones de los tratamiento 7 y 8 con 1.5 y 3.0 ppm de metstopolina y 1.0 ppm de 2,4-D la respuesta es la misma, mientras que en el tratamiento 9 con 4.0 ppm de matetoplona y la misma cantidad de 2,4-D con 1.0 ppm se observo que el incremento en la formacion de callo dos veces. Se determinó que el 2,4-D es un

regulador de crecimiento más eficaz en comparación con la adición de ANA para la inducción de cultivos de callos (Rathore M. S., 2011)

**Cuadro 7.** Los tratamientos metatopolina (MT) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) tuvieron mejor respuesta en el desarrollo de la formación de callosidad. Siendo los tratamientos 7, 8 y 9 los mejores para el desarrollo de callo con un total de 4 formaciones de tejido desdiferenciado.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MT metatopolina (ppm)</b>	<b>2,4-D ac. 2-4 diclorofenoxiacético (ppm)</b>	<b>CALLO</b>
1	1.5	0.3	0
2	3.0	0.3	0
3	4.0	0.3	0
4	1.5	0.5	0
5	3.0	0.5	0
6	4.0	0.5	0
7	1.5	1	1
8	3.0	1	1
9	4.0	1	2

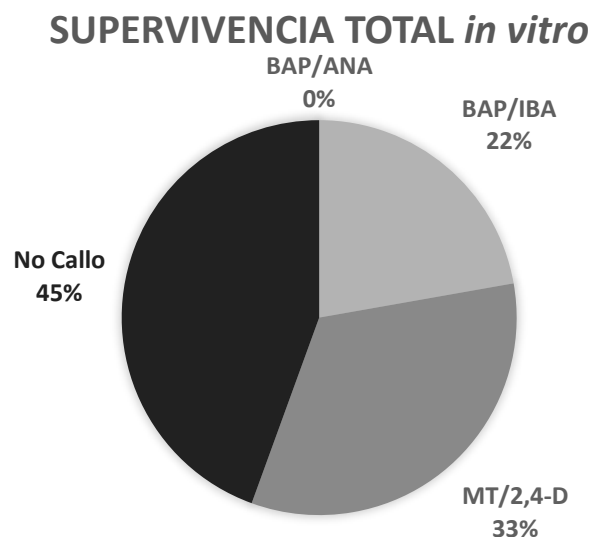
En la evaluación de la supervivencia de la respuesta vegetativa para la formación de callogénesis se observó que el tamaño del explante superior a 0.5 cm a los 15 días de tratamientos, con un porcentaje de supervivencia en el tratamiento con combinación MT/2,4-D con un porcentaje de supervivencia de 33.33% y de formación de callo mayor que en los otros casos. Mientras que el tratamiento de BAP/IBA con un numero menor de callosidad y 22.22% de sobrevivencia. La no formación de callo ocurrió en el 44.44% de los casos, esto quiere decir, que la utilización de potenciación de citocinas y auxina para la formación de callo en hipocótilos superiores de plántulas de cannabis sativa es mejor con la combinación

MT/2,4-D en un 33.33%, mientras en segundo término la combinación BAP/IBA con el 22.22% de éxito. Diversas fuentes sugieren que el uso de metatopolina es una mejor alternativa al 6-bencilaminopurina en el cultivo de tejidos vegetales. El metabolismo y los efectos *in vitro* de ambas citoquininas fue comparada.

Las plantas que se desarrollaron en medio con 10  $\mu$ M o más de MT arraigaron mejor durante la aclimatación que las que se desarrollaron en medio con concentraciones equimolares de BAP (Debergh, 1996).

**Cuadro 8:** Supervivencia de los tratamientos de auxinas y citocinas para la tasa de formación de callo mayor a 0.5 cm de diámetro.

Supervivencia <i>in vitro</i>		
Tratamiento (9 TT)	# Callo (>0.5 cm)	%
BAP/ANA	0	0
BAP/IBA	2	22.22
MT/2,4-D	3	33.33
Negativos	-	44.44



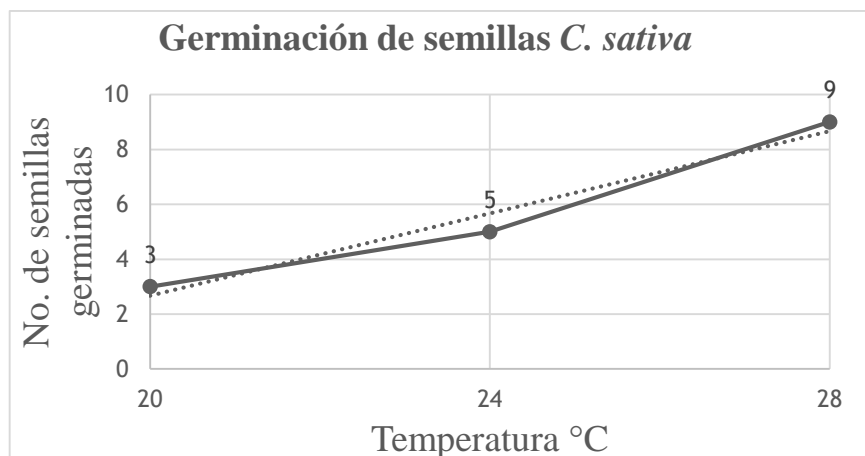
**Figura 9.** Tasa de formación de callo de los tratamientos de combinación citocinina y auxinas. Se puede observar que la inducción de callo fue favorable para una planta silvestre como lo es *C. sativa*, en la combinación de citocininas y auxinas con un 55% utilizando un explante preferentemente mayor de 0.5 cm.

Método I d.

Método embibón previo a *in vitro*.

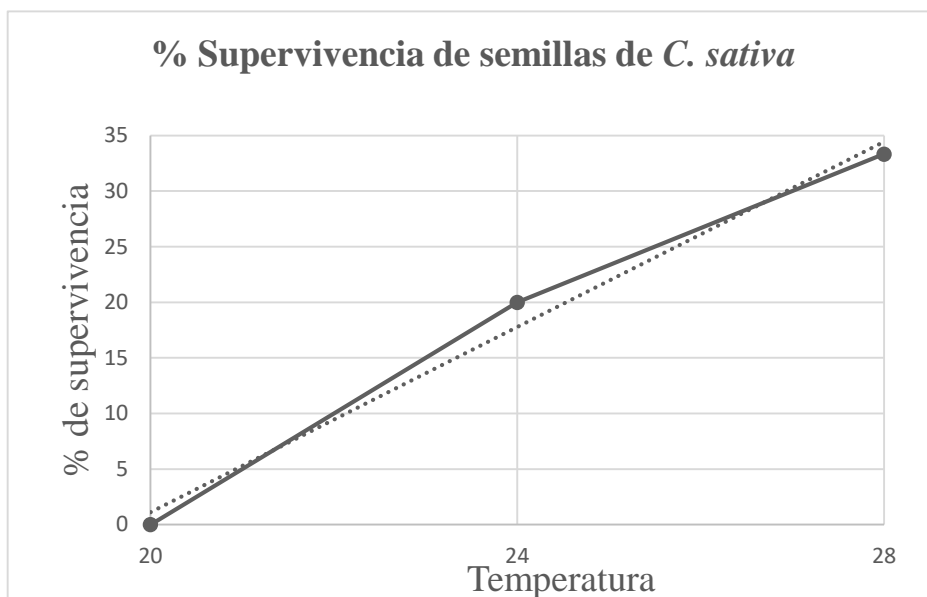
Para el método de embibón (I d), además se evaluaron el tiempo de emergencia y la temperatura, cuyos resultados fueron observados cada 24 horas, en donde se observa en la figura 9 el porcentaje de supervivencia y germinación, donde ambos parámetros depende de la temperatura ya que la diferencia de 4°C entre los tres tratamientos el número de éxito en la germinación se duplica.

Para la germinación de semillas de *C. sativa* la metodología embibón tuvo un desarrollo favorable a una temperatura superior a la del ambiente. Es decir, la mejor temperatura para romper la cubierta de la semilla fue a 28°C (Figura 10).



**Figura 10.** Número de semillas germinadas de *C. sativa* en método embibón a diferentes temperaturas ( $T_1=20^\circ\text{C}$ ,  $T_2=24^\circ\text{C}$ ,  $T_3=28^\circ\text{C}$ ) con 10 semillas por ensayo dentro de incubadora FELISA®. Se observa el incremento en la tasa de germinación con respecto a la temperatura. Se observó un crecimiento exponencial con 20°C el porcentaje de germinación fue del 30% mientras que a 24°C un 50%, por último a 28°C con un 90%.





**Figura 11.** El porcentaje de supervivencia en método embibón con temperatura controlada en incubadora FELISA® muestra un 0% de supervivencia a 20°C, mientras que se muestra una mejoría sutil a 24°C con 20% y el mejor desempeño en temperatura fue de 28°C con un 33.33% de supervivencia con formulación MS 50% v/v fuerza de sales.

**Cuadro 9.** Supervivencia con temperatura diferenciada.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de SUPERV es la misma entre categorías de TEMPERATURA.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.508	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de .050.

**Cuadro 10.** Resumen de prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes.

<b>N total</b>	17
<b>Estadístico de prueba</b>	1.354 <sup>a,b</sup>
<b>Grado de libertad</b>	2
<b>Sig. asintótica (prueba bilateral)</b>	.508

a. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

b. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

Las metodologías de germinación por almácigo I a y germinación por embibón I d se observaron que fueron notoriamente favorables a una disponibilidad de hidratación continua y temperaturas superiores a 28°C. Respecto a estímulos de crecimiento controlados *in vitro* cuyas temperaturas oscilaban de un 20~25°C.

### Germinación con temperatura diferenciada

**Cuadro 11.** Resumen de contrastes de hipótesis.

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GERM es la misma entre categorías de TRAT.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.025	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de .050.

**Cuadro 12.** Comparaciones por parejas de tratamientos.

Sample 1- Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
T BAJA-T MEDIA	-3.000	3.381	-.887	.375	1.000
T BAJA-T ALTA	9.000	3.381	2.662	.008	.023
T MEDIA-T ALTA	6.000	3.381	1.775	.076	.228

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de .05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

En el método embibón, la temperatura sí influye en la emergencia y supervivencia ya que a 20°C no obtuvo supervivencia mientras que la emergencia se observó favorecida a temperaturas superiores a los 24°C y con porcentajes favorables tanto en la emergencia como la supervivencia a 28°C.

## V. CONCLUSION

La evaluación de las metodologías *in vivo* e *in vitro* lograron ser establecidas para su micropropagación. El protocolo desarrollado por organogénesis directa fue establecido para un cultivo de regeneración eficiente *in vitro* para una futura producción a escala. Las técnicas de cultivo *in vitro* proporcionan una mejora en la técnica de propagación clonal para reducir la variación del germoplasma de *C. sativa* para la obtención de un producto con requerimientos especiales para su consumo como lo es el espacio utilizado y libres de enfermedades. La respuesta morfológica a diferentes concentraciones de auxinas y citocinas en el medio de cultivo *in vitro* para la obtención de callo tuvieron mejores respuestas bajo los tratamientos de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y metatopolina (MT). Un protocolo efectivo para la propagación de meristemo apical en planta madre y su establecimiento, fue desarrollado efectivamente con ácido giberélico (GA3) como coadyuvante. Además, las altas concentraciones de los reguladores de crecimiento, dentro de los tratamientos, favorecieron el desarrollo completo de organogénesis y rizogénesis para su multiplicación *in vitro* comparado con medio sin reguladores de crecimiento. La temperatura resulto ser un factor determinante tanto para la germinación como para la sobrevivencia de la emergencia del tejido a partir de semillas.

## VI. LITERATURA CITADA

- Bergamaschi M., H. C. (2011). Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Current drug safety*, 6(4), 237-249.
- Bourgaud, F. G. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 839-851.
- Brian F.Thomas, M. A. (2016). The Analytical Chemistry of Cannabis. En M. A. Brian F.Thomas, *The Botany of Cannabis sativa L.* (págs. 1-26). Mississippi: ELSEVIER.
- Casillas, A. (2017). Propagation of Cannabis sativa for commercial. *Acta Hortic*, 157-158.

- Christelle M. Andre, J.-F. H. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7-19.
- Das Bhowmik SS, B. A. (2016). Direct shoot organogenesis from rhizomes of medicinal zingiber and evaluation of genetic stability by RAPD and ISSR markers. *J Crop Sci Biotechnol* , 157-165.
- Debergh, S. P. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum* .
- FDA. (2020). *Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD)*. U.S. Food and Drug Administration.
- H. Lata, S. C. (2015). In Vitro Propagation of Cannabis sativa L. Using meta-Topolin. *Thieme*.
- H. Lata, S. C. (2017). Micropropagation of Cannabis sativa L. *Springer*, 285-297.
- H.Smith, R. (2013). Media Components and Preparation. En R. H.Smith, *Plant Tissue Culture (Third Edition)* (págs. 31-43). Texas: ELSEVIER.
- Haixia Dang, Y. L. (2014). Traditional Chinese medicine—a potential countermeasure to stressors associated with space missions. *Human performace in space: Advancing Astronautics research in China.*, 21-23.
- Izzo, A. A. (2009). Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in pharmacological sciences*, 30(10), 515-527.
- J. Bhattacharya, S. K. (2001). *ELSEVIER*, 39-49.
- Joshua A.Hartsel, J. E. (2016). Cannabis sativa and Hemp. En *Nutraceuticals* (págs. 735-754). Academic Press.
- Kyauk, H. H. (1995). Effect of temperature and presoaking on germination, root length and shoot length of sesame (*Sesamum indicum*L.). . *Environ. Exp. Bot*, 345-351.
- Lataa H., C. S. (2015). In vitro mass propagation of Cannabis sativaL.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *ELSEVIER*, 0-9.
- Lataa H., C. S. (2016). In vitro mass propagation of Cannabis sativa: a protocol refinement using novel aromatic cytokinin metatopolin and the assessment of ecophysiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 18–26.
- Mandolino G., R. P. (1999). Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. *Advances in hemp research. New York: Haworth Press*, 185-208.
- Martínez, L. O. (2013). Efecto de las giberelinas sobre el crecimiento y calidad de plántulas de tomate. . *Biotecnia*, 56-60.

- Meléndez-Sosa MF., A. M.-B.-G. (2020). PERSPECTIVAS E IMPACTO EN LA SALUD DEL CONSUMO DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS EN MÉXICO. *RD-ICUAP*, 114-136.
- Murashige, T. (1973). Nutrition of plant cells and organs in vitro. . *In vitro*, 81-85.
- Murthy, H. N. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-16.
- Pancholi N., W. A. (1995). Germination of *Musa velutina* seeds: comparison of in vivo and in vitro systems. *In vitro Cell Dev. Biol. Plantarum* , 127-130.
- Pérez, A. B. (2014). Sistema Mexicano De Alimentos Equivalentes / 4 Ed. En A. B. Perez Lizaur, *Enfermería Y Promoción De La Salud* (pág. 164). Cuadernos De Nutrición (Fomento De Nutrición Y Salud).
- Rathore M. S., C. J. (2011). Plantlet Regeneration from Callus Cultures of Selected Genotype of *Aloe vera* L.—An Ancient Plant for Modern Herbal Industries. *Springer*, 860–868.
- S. Chandra, H. L. (2012). The Role of Biotechnology in Cannabis Propagation for the Production of Phytocannabinoids. *Biotechnology for Medicinal Plants*, 123-148.
- S. Chandra, H. M. (2016). Cannabis cultivation: Methodological issues for obtaining medical-grade product. *ELSEVIER*, 8-9.
- S. Frassinetti, E. M. (2018). Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 39.
- Santacruz F., J. J. (2014). Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación in vitro de *Cordia alliodora* A. DC. *SCIELO*, 20.
- Smith, R. H. (2013). Media Components and Preparation. *Plant Tissue Culture*, 31–43.
- T. Isah, S. U. (2017). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Springer*, 239–265.
- Valenzuela B., A. S. (2014). Alimentos funcionales, Nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición*, 41(2).
- White, C. M. (2019). A review of human studies assessing cannabidiol's (CBD) therapeutic actions and potential. . *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(7), 923-934.
- Williamson, E. M. (2020). Trends in use, pharmacology, and clinical applications of emerging herbal nutraceuticals. . *British Journal of Pharmacology*, 177(6), 1227-1240.